

AKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK FRAKSI *n*-HEKSAN DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens*. JACK) TERHADAP BEBERAPA BAKTERI DENGAN METODE KLT-BIOAUTOGRAFI

Arna Ningsih dan Arsyik Ibrahim
Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman

ABSTRACT

*Infectious diseases are still a serious problem in Indonesia, as well as the more widespread microbial resistance to antibiotics available. Traditional medicinal plants known potential to be developed as a source of infectious disease treatment is Sungkai Plant (*Peronema canescens*. Jack). This study aims to determine the antimicrobial activity of leaf extracts of n-hexane Sungkai with KLT-bioautografi method against some microbial testing. Microbial testing is used as much as 3 types of gram-positive bacteria that is *Basillus subtilis*, *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. The extraction method used to get the n-hexane fraction obtained from liquid-solid partition using n-hexane. Preliminary research conducted by the screening test n-hexane extract of the solid dilution method with DMSO as a negative control. Preliminary results obtained n-hexane extract gave growth inhibition against all the test bacteria at levels of 1 mg / ml. while the antibacterial activity of the test results-bioautografi TLC method showed some active spots with a diameter of clear zone and a different price Rf. Active spot detection using stain apparition UV 254 nm, 366 nm and 10% H₂SO₄ spray reagent. Active Spot-bioautografi KLT test results obtained by the four active spots on three types of bacteria that test *B. subtilis*, *St. mutans* and *S. aureus* with Rf value detection results reagent H₂SO₄ 10%, respectively each is Rf 0.75 cm with brown spots, Rf 0, 68 cm purple, brown Rf 0.29 cm and Rf 0.21 cm brown.*

Key words : Sungkai leave, fractination, microbial, bioautography-TLC

ABSTRAK

Penyakit infeksi saat ini masih menjadi masalah serius di Indonesia, serta semakin meluasnya resistensi mikroba terhadap obat antibiotika yang tersedia. Tanaman obat tradisional diketahui potensial untuk dikembangkan sebagai sumber pengobatan penyakit infeksi adalah Tumbuhan Sungkai (*Peronema canescens*. Jack). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak n-heksan daun Sungkai dengan metode KLT-bioautografi terhadap beberapa mikroba uji. Mikroba uji yang digunakan sebanyak 3 jenis bakteri gram positif yaitu *Basillus subtilis*, *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*. Metode ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan fraksi n-heksan diperoleh dari partisi cair-padat menggunakan n-heksan. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan uji skrining ekstrak n-heksan dengan metode dilusi padat dengan DMSO sebagai kontrol negatif. Hasil penelitian pendahuluan diperoleh ekstrak n-heksan memberikan hambatan pertumbuhan terhadap seluruh bakteri uji pada kadar 1 mg/ml. sedangkan hasil pengujian aktivitas antibakteri metode KLT-bioautografi menunjukkan beberapa spot aktif dengan diameter zona bening dan harga Rf yang berbeda. Deteksi spot aktif menggunakan penampak noda sinar UV 254 nm, 366 nm dan

pereaksi semprot H_2SO_4 10%. Spot aktif hasil uji KLT-bioautografi diperoleh empat (4) spot aktif terhadap 3 jenis bakteri uji yaitu *B. subtilis*, *St. mutans* dan *S. aureus* dengan nilai Rf masing – masing adalah Rf 0,75 cm dengan spot berwarna coklat dengan pereaksi H_2SO_4 10%, Rf 0,68 cm berwarna ungu, Rf 0,29 cm berwarna coklat, dan Rf 0,21 cm berwarna coklat.

Kata kunci : Daun Sungkai, fraksinasi, mikroba, KLT-bioautografi.

PENDAHULUAN

Besarnya potensi alam flora yang kita miliki memungkinkan kita melakukan riset untuk memperoleh senyawa bioaktif yang berkhasiat sebagai antimikroba. Hal ini mungkin dapat menjawab kebutuhan pasar akan obat-obat baru baik domestik maupun internasional. Saat ini obat antimikroba standar yang ada sekarang semakin berkurang efektivitasnya, karena banyak bakteri patogen sudah mulai resisten terhadap antimikroba yang digunakan saat ini. Hal tersebut mendorong pentingnya penggalian sumber obat-obatan antimikroba lain dari bahan alam. Tanaman obat tradisional diketahui potensial untuk dikembangkan lebih lanjut pada pengobatan penyakit infeksi, namun masih banyak yang belum dibuktikan bioaktivitasnya secara ilmiah (Hertiani, 2003).

Salah satu tumbuhan obat yang banyak tumbuh di Indonesia yang banyak dimanfaatkan adalah tumbuhan Sungkai (*P. canescens*.Jack). Pada suku Dayak di Kalimantan Timur sampai saat ini masih tetap mempertahankan tradisi dengan memanfaatkan tumbuhan disekitarnya untuk pengobatan ataupun perawatan kesehatan misalnya tumbuhan Sungkai (*P. canescens*. Jack) suku verbenaceae pada bagian daun muda digunakan sebagai obat pilek, demam, obat cacingan (*ringworms*), dijadikan mandian bagi wanita selepas bersalin dan sebagai obat kumur Pencegah sakit gigi (Mardi, 2010). Tumbuhan ini

merupakan tumbuhan khas Indonesia yang terdapat di Sumatera bagian Selatan dan Kalimantan (Murningsih, dkk., 2005). Hasil Penelitian ekstrak etanol Daun Sungkai memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit jantan galur Swiss dengan ED₅₀ 102 mg/kgBB (Suwandi, 2006). Ekstrak daun sungkai juga terbukti mempunyai sifat antiparasitik yaitu pada kultur *in vitro* *Babesia gibsoni* (Subeki, dkk., 2004).

Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak n-heksan daun Sungkai dengan metode KLT-bioautografi terhadap beberapa mikroba uji.

METODE

Bahan

Air suling, biakan murni (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus mutans*), daun sungkai (*Peronema canescens*. Jack), dimetil sulfoksid (DMSO), larutan natrium klorida fisiologis 0,9%, lempeng KLT PF₂₅₄ (E.Merck), medium Glukosa Nutrien Agar (GNA), pelarut organik metanol dan n-heksan, seperangkat lampu UV 254 nm dan 266 nm, pereaksi semprot asam sulfat 10%.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daun Sungkai kering diekstraksi secara maserasi dengan metanol selama 1 x 24 jam sebanyak 14,5 liter, proses maserasi

diulangi sebanyak 3 kali. Filtrat dikumpulkan lalu diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak metanol kental kemudian dikeringkan di dalam vakum desikator. Ekstrak metanol kental dipartisi cair-padat dengan pelarut n-heksan. Fraksi n-heksan selanjutnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze drying*. (Houghtin., dkk., 1998). Ekstrak n-heksan selanjutnya dilakukan pengujian aktifitas antimikrobanya dengan metode dilusi padat terhadap 3 jenis bakteri uji yaitu *Basillus subtilis*, *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*. Fraksi n-heksan selanjutnya dielusi pada lempeng KLT PF 254 menggunakan perbandingan eluen dengan gradien kepolaran berbeda, selanjutnya dimonitoring komponen senyawa kimianya menggunakan penampak noda sinar UV 254 nm, 366 nm dan pereaksi semprot H₂SO₄ 10%.

Pengujian Fraksi n-heksan dengan Metode KLT-Bioautografi

Fraksi nheksan selanjutnya diuji aktivitas senyawa antimikrobanya dengan metode Kromatografi Lapis Tipis–Bioautografi yaitu dengan meletakkan lempeng KLT di atas permukaan medium agar padat selama 0,5 - 1 jam yang sebelumnya telah dielusi. Hasil pengujian KLT-bioautografi dengan spot/noda yang memberikan zona penghambatan pada permukaan media agar padat (Djide, 2010).

Analisis Data

Data profil Kromatografi Lapis Tipis meliputi warna spot pada penampak noda sinar UV 254 nm, 366 nm dan pereaksi semprot H₂SO₄ 10%, nilai *range of folw* (Rf) dan zona bunuh hasil KLT-

bioautografi dinalisis secara kualitatif deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Ekstraksi Sampel

Serbuk kering daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) yang diekstraksi dengan metode maserasi sebanyak 1100 gram menggunakan pelarut metanol, Ekstrak metanol yang diperoleh sebanyak 53, 63 gram, kemudian dipekatkan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol kental, selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh diangin - anginkan sampai ekstrak menjadi kering. Ekstrak metanol kering selanjutnya dipartisi dengan n-heksan dengan metode partisi padat – cair, dari hasil partisi ekstrak metanol diperoleh ekstrak n-heksan diperoleh 32,29 gram. Partisi dilakukan bertujuan untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan tingkat kepolarannya. Prinsip partisi ini pada umumnya menggunakan satu macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang lebih rendah dari pelarut ekstrak yang dipartisi. Senyawa kimia yang sifatnya relatif non polar akan larut pada pelarut yang kepolarannya lebih rendah, sedangkan senyawa polar larut dalam pelarut yang kepolarannya lebih tinggi.

2. Hasil Pengujian Skrining Antimikroba

Pengujian skrining antimikroba ekstrak kasar methanol dan ekstrak fraksi n-heksan daun Sungkai pada konsentrasi 1 mg/ml medium atau 1000 ppm dilakukan terhadap bakteri, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Streptococcus mutans*, diperoleh hasil bahwa ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi n-heksan menunjukkan aktivitas terhadap ke tiga bakteri uji pada konsentrasi 1000 ppm.

Menurut Hoffman (1991), ekstrak yang menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroba uji pada kadar tersebut potensial untuk diteliti lebih lanjut daya antimikrobanya. Metode dilusin padat memiliki keunggulan yaitu tidak memperhitungkan kemampuan senyawa atau ekstrak untuk berdifusi ke dalam medium dan tidak dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium. Selain itu metode ini relatif lebih praktis, mudah, dan menghemat medium yang digunakan.

Aktivitas antibakteri pada pengujian skrining ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi dihambat atau pertumbuhan itu lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya (Ibrahim, A. 2011).

Mikroba uji yang digunakan pada penelitian ini adalah adalah *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, dan *Staphylococcus aureus*. Pemilihan mikroba uji tersebut karena sifat-sifatnya yang patogenik. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri gram positif, batang panjang, bersifat aerobik, dan membentuk spora yang dapat tumbuh pada makanan dan menyebabkan infeksi kulit (luka, bisul, borok). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat, bergerombol seperti buah anggur, tidak berspora, penyebab infeksi pada kulit (osteomielitis) (Djide, 2008). *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat seperti rantai, bersifat aerobik atau anaerobik, yang dapat menyebabkan karies gigi dan infeksi pada mulut. (Syahrurrahman, dkk., 1994),

(Strohl *et al.*, 2001). Hasil skrining awal dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Kontrol negatif digunakan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai pembanding. DMSO digunakan sebagai pelarut ekstrak sehingga dapat terdispersi merata diseluruh medium untuk mendapatkan hasil yang homogen. Hasil pengujian menunjukkan tidak memberikan aktivitas pembunuhan.

3. Hasil KLT dan Pengujian KLT-Bioautografi Ekstrak fraksi n-Heksan

Hasil pemisahan senyawa dengan lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) PF 254 ekstrak n-heksan menggunakan eluen heksan : etil asetat (4 :1) dengan penampak noda sinar UV 254 nm diperoleh 10 noda, sinar UV 366 nm diperoleh 8 noda, dan reagen kimia H₂SO₄ 10% diperoleh 10 noda. Hasil pengujian KLT-Bioautografi ekstrak n-heksan eluen kloroform : metanol (40:1) menunjukkan bahwa terdapat 4 noda yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap seluruh bakteri uji. Data kromatografi lapis Tipis dan hasil pengujian KLT-bioautografi selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3, dan 4.

Lempeng-lempeng hasil elusi diuji aktivitasnya dengan metode KLT-Bioautografi. Hasil pengujian KLT-Bioautografi ekstrak n-heksan dengan eluen kloroform : metanol (40:1), diperoleh spot dengan nilai R_f 0,75 aktif terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedang untuk nilai R_f 0,68 aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans*. Spot dengan nilai R_f 0,29 dan 0,21 aktif terhadap bakteri, ketiga bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Streptococcus mutans*. Berdasarkan

*Aktifitas Antimikroba Ekstrak Fraksi n-Heksan Daun Sungkai (*Peronema canescens*. JACK) Terhadap Beberapa Bakteri Dengan Metode KLT-Bioautografi*

hasil pengujian KLT-bioautografi spot noda dengan nilai Rf 0,29 dan Rf 0,21 menunjukkan noda-noda yang memiliki kemampuan penghambatan paling baik

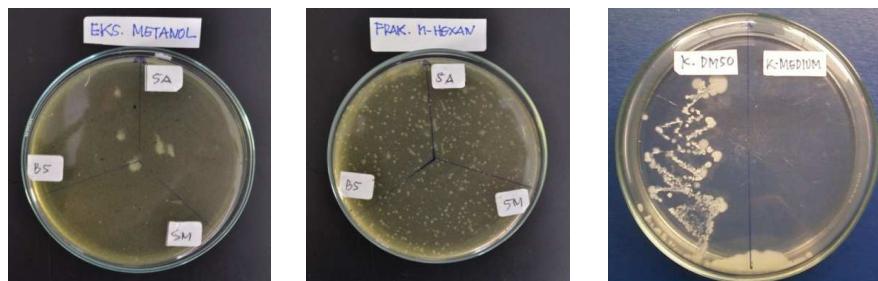
diantara noda-noda lainnya, dan dimungkinkan untuk penelitian isolasi senyawa aktifnya. Hasil pengujian ini dapat dilihat pada gambar 3.

Tabel 1. Hasil pengujian skrining antimikroba ekstrak kasar methanol dan ekstrak fraksi n-heksan daun Sungkai (*P. canescens* Jack)

Konsentrasi Sampel (1000 ppm)	Bakteri Uji		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Ekstrak metanol	+	+	+
Ekstrak n-heksan	+	+	+
K(-)	-	-	-
Km	-	-	-

Keterangan :

Km : kontrol medium NA steril + : menghambat pertumbuhan mikroba
K(-) : kontrol negatif (DMSO) - : tidak menghambat pertumbuhan mikroba



Gambar 1. Foto hasil skrining antimikroba ekstrak kasar methanol dan fraksi n-heksan daun Sungkai (*Peronema canescens*. Jack)

Keterangan :

BS	: <i>Bacillus subtilis</i> ;	SA	: <i>Staphylococcus aureus</i> ;
SM	: <i>Streptococcus mutans</i> ;	K(-)	: Kontrol negatif (DMSO);
K(m)	: Kontrol medium steril NA		

Tabel 2. Hasil profil kromatografi lapis tipis ekstrak n-heksan daun sungkai (*Peronema canescens*. Jack).

Ekstrak	Spot	Penampak Noda					
		UV 254 nm		UV 366 nm		H_2SO_4 10%	
		Rf	Warna	Rf	Warna	Rf	Warna
n-heksan	1	0,93	Hijau	0,94	Ungu tua	0,89	Coklat
	2	0,80	Hijau	0,78	Ungu tua	0,85	Hijau
	3	0,75	Ungu	0,63	Ungu	0,73	Hijau
	4	0,68	Ungu	0,56	Ungu	0,69	Coklat
	5	0,63	Hijau	0,50	Ungu	0,63	Kuning
	6	0,50	Ungu	0,38	Ungu	0,56	Ungu
	7	0,44	Ungu	0,30	Ungu tua	0,50	Ungu
	8	0,36	Biru gelap	0,21	Ungu tua	0,39	Coklat
	9	0,29	Biru gelap	-	-	0,34	Coklat
	10	0,21	Biru gelap	-	-	0,24	Coklat

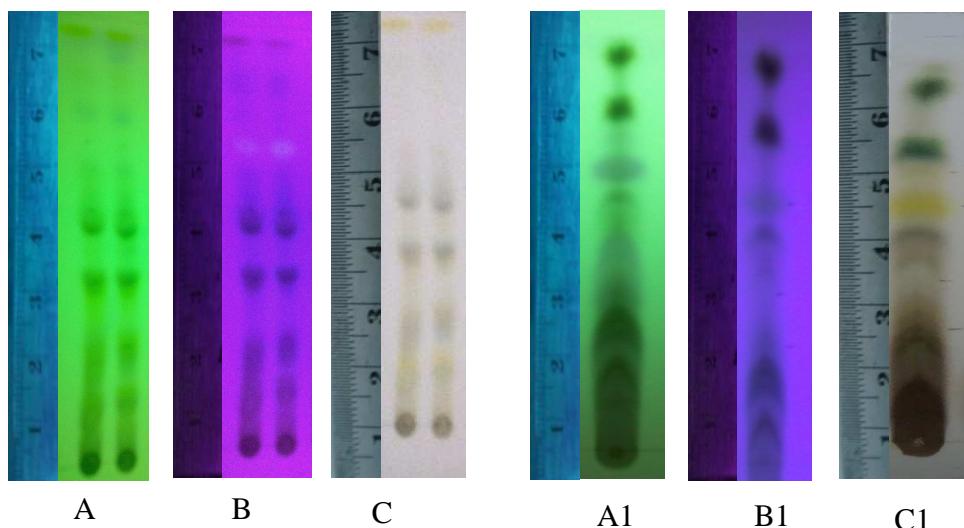
*Aktifitas Antimikroba Ekstrak Fraksi n-Heksan Daun Sungkai (*Peronema canescens*. JACK) Terhadap Beberapa Bakteri Dengan Metode KLT-Bioautografi*

Tabel 3. Profil kromatogram lempeng KLT-Bioautografi ekstrak n-heksan daun sungkai

Ekstrak	Rf	Penampak Noda			Bakteri yang dihambat
		UV 254	UV 366	H ₂ SO ₄ 10%	
n-heksan	0,75	ungu	ungu	Coklat	Sa, Bs, Sm
	0,68	ungu	ungu	Ungu	Sa, Bs, Sm
	0,29	biru	ungu	coklat	Sa, Bs, Sm
	0,21	biru	ungu	coklat	Sa, Bs, Sm

Keterangan : Sm : *Streptococcus mutans*, Sa : *Staphylococcus aureus*, Bs : *Bacillus subtilis*

Gambar Profil kromatogram ekstrak kasar metanol dan fraksi n-heksan, profil KLT-bioautografi dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Foto profil kromatogram ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi n-heksan daun Sungkai.

Fase diam Silica Gel 60 PF 254; fase gerak n-heksan : etil asetat (4:1) dan CHCl₃ : MeOH (40 :1)

Keterangan :

Penampak noda : A dan A1 : Sinar UV 254 nm, B dan B1 : Sinar UV 366 nm, C dan C1 : H₂SO₄ 10%



Gambar 3. Foto hasil KLT-bioautografi ekstrak n-heksan daun sungkai (*Peronema canescens*. Jack), cairan pengelusi CHCl₃ : MeOH (40 : 1)

KESIMPULAN

Hasil penelitian aktifitas antimikroba ekstrak fraksi n-heksan daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) dengan metode KLT-bioautografi diperoleh diperoleh 4 (empat) spot aktif memberikan zona bening/bunuh terhadap 3 jenis bakteri uji yaitu *B. subtilis*, *St. mutans* dan *S. aureus* dengan nilai Rf hasil identifikasi penampak noda H_2SO_4 10% masing – masing 0,75 cm spot berwarna coklat, Rf 0,68 cm berwarna ungu, Rf 0,29 cm dan Rf 0,21 berwarna coklat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Pemerintah Propinsi Kalimantan Timur yang telah memberikan dana penelitian, Pimpinan Fakultas Farmasi dan kepada kepala Laboratorium Biologi dan Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam UP. Fakultas Farmasi UNMUL yang telah memberikan izin menggunakan laboratorium untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Djide. N., M. **2010.** *Mikrobiologi Farmasi.* Jurusan Farmasi F.MIPA. Universitas Hasanuddin. Makassar. 45-47.
2. Hertiani,T., Palipi, S.I., Sanliferianti, dan Nurwindasari, D.H., **2003,** *Uji Invitro Antimikroba Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Shygella dysentriae* dan *Candida albicans* Dari Beberapa Tanaman Obat Tradisional Untuk Penyakit Infeksi.* Jurnal Farmasi Indonesia Pharmacon. Volume 4 (2), Desember 2003. 89-95
3. Houghtin, P.J., Raman, A. **1998.** *Laboratory Handbook for the Fractinatio of Natural Etrack.* Chapman & Hall. 6-7
4. Ibrahim, A., **2011.** Aktivitas Antimikroba Ektrak Daun Rami (*Boehmeria virgata* (Forst.) Guill terhadap Beberapa Mikroorganisme. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry.* Vol. 1 No. 2 : 86-93)
5. Mardi. **2010.** Koleksi Herba Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia. (Online). <http://wannura.wordpress.com>. diakses tanggal 12 Juni 2011
6. Mathias, O., Hamburger and Geoffrey A. Cordell., **1987.** *A Direct Bioautographic Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activiity.* Journal of Natural Products. Vol. 50. No.1. 19 - 22.
7. Murningsih, T., Subeki., Matsuura, H., Takahashi, K., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y., Katakura, K., Suzuki, M., Kobayashi, S., Chairul., Yoshihara, T. **2005.** *Evaluation of Inhibitory Activities of The Extracts of Indoneisan Traditional Medical Plants Againts *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*.* J. Vet. Med. Sci., 67, 8: 829-31.
8. Subeki., Matsuura, H., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y., Katakura, K., Suzuki, M., Trimurningsih., Chairul., Yoshihara, T., **2004.** *Effects of Central Kalimantan Plant Extracts on Intraerythrocytic *Babesia gibsoni* in Culture.* J. Vet. Med. Sci., 66, 7: 871-4
9. Suwandi, D. **1995.** *Uji Pendahuluan Ekstrak Etanol Daun Sungkai (Peronema canescens Jack) Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei* (ANKA) pada Mencit Putih Strain Swiss.* Padang: Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas.
10. Strohl, W *et al.* **2001.** *Lippincott's Illustrated Reviews : Microbiology.* Lippincott Williams & Wilkins. A Walters Kluwer Company. Baltimore. Maryland. USA. 4.